

# PREPARAÇÃO POR BIOCONVERSÃO DE NOVOS DERIVADOS *N*-FENILPIPERAZÍNICOS CANDIDATOS A PROTÓTIPOS DE FÁRMACOS

GOMES, Tatiana Caixeta Ferreira<sup>1</sup>; DE OLIVEIRA, Valéria<sup>2</sup>

Palavras-chave: Bioconversão, derivados funcionalizados, LASSBio 579,

## 1. INTRODUÇÃO

Bioconversão refere-se aos processos enzimaticamente catalisados capazes de produzir modificações estruturais no fármaco. Essas variações estruturais podem conferir novas propriedades físico-químicas, alterando a reatividade de uma molécula tendo como consequência mudanças na distribuição nas células e nos tecidos, no acesso aos centros ativos de enzimas e receptores originais, nas velocidades de reação em tais centros, ou ainda favorecer novas interações com outras biomacromoléculas, correspondendo a novos e distintos efeitos biológicos (AZERAD, 1999; SRISILAM; VEERESHAM, 2003). As reações de bioconversão utilizando fungos filamentosos dotados de monooxigenases capazes de hidroxilar moléculas, têm sido bastante exploradas e os resultados obtidos são muito interessantes para estudos do metabolismo. Os modelos microbianos do metabolismo animal, baseados na similaridade do metabolismo hepático e enzimático microbiano, tornaram-se uma alternativa promissora para a elucidação da rota metabólica de fármacos. Redução da demanda por animais de laboratório, precisão, reprodutibilidade e baixo custo são vantagens para a obtenção de metabólitos, por esta estratégia. O LASSBio 579 é um novo derivado *N*-fenilpiperazínico sintetizado a partir da clozapina, apresentando, além da atividade antipsicótica, decorrente do antagonismo de receptores dopaminérgicos D2, propriedades pró-eréteis decorrentes do agonismo desse tipo de receptores (NEVES et al., 2004) (Figura 1). A funcionalização de compostos como o LASSBio 579 *via* bioconversão possibilita a obtenção de derivados com possíveis atividades biológicas, além de permitir a síntese de prováveis metabólitos animais, que auxiliarão em posteriores estudos farmacológicos e toxicológicos. Dessa forma, o LASSBio-579 será submetido a estudos de bioconversão empregando diferentes cepas de microrganismos dotadas de sistemas enzimáticos capazes de mimetizar o metabolismo humano, possibilitando a obtenção de metabólitos funcionalizados, que serão posteriormente isolados, purificados e caracterizados estruturalmente, de modo a viabilizar a preparação destes em escalas que permitam a determinação das propriedades físico-químicas, estudos farmacológicos e farmacocinéticos, possibilitando a avaliação do perfil terapêutico dos derivados.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1 – Caracterização do substrato

O substrato utilizado neste trabalho, LASSBio-579 (1-[-(4-clorofenil)-1H-pirazol-4-metil]-4-fenil-piperazina), foi desenvolvido e sintetizado no Laboratório de Avaliação e

Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio) – FF/UFRJ. Mostrou-se solúvel em metanol e dimetilformamida e parcialmente solúvel em etanol.

### 2.1 – Screening

Para a realização do *screening* foram selecionados 15 microrganismos procedentes de coleções internacionais (American Type Culture Collection, Rockville, Md, USA - ATCC e Northern Utilisations Research and Development Division, Peoria-Illions, USA - NRRL): *Absidia blakesleana* ATCC 26617, *Absidia blakesleana* ATCC 10148b, *Aspergillus candidus* ATCC 2023, *Aspergillus ochraceus* ATCC 1009, *Beauveria bassiana* ATCC 7149, *Chaetonium indicum* LCP 984200, *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245, *Cunninghamella elegans* ATCC 36112, *Cunninghamella elegans* ATCC 26169, *Curvularia lunata* NRRL 2380, *Fusarium roseum* ATCC 14717, *Mortierella isabelina* NRRL 1757, *Mucor griseocyanus* ATCC 1207a, *Rhizopus arrhizus* ATCC 11145. As cepas foram repicadas e mantidas em tubos de ensaio contendo meio sólido ágar batata inclinado por sete dias em câmara germinativa BOD para crescimento da cultura. Esses microrganismos foram inoculados em erlenmeyers contendo meio líquido *Potato Dextrose Soy Medium* (PDSM) e mantidos em incubador rotativo à 27°C, 200 rpm, por 65 horas para crescimento. Após esse período, 10mg do substrato LASSBio 579 solubilizado em mistura de etanol/dimetilformamida 1:1, foi adicionado em cada um dos Erlenmeyers e alíquotas foram coletadas nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas de incubação.

### 2.2 – Análise do substrato e das alíquotas

As alíquotas foram centrifugadas e os sobrenadantes de incubação obtidos, assim como o substrato, foram analisados por cromatografia de camada delgada (CCD), onde as alíquotas foram saturadas com cloreto de sódio, extraídas com acetato de etila e aplicadas em cromatofolhas de alumínio TCL 20x20cm sílica gel 60 F<sub>254</sub>. Foram testadas três fases móveis para estas análises: acetato de etila/metanol 95:05, acetato de etila/metanol 60:40 e acetato de etila/metanol 20:80, dentre as quais utilizou-se acetato de etila/metanol 95:05, e reveladores iodo e luz UV (254 e 365nm). Para CLAE, foram analisados o substrato e as alíquotas referentes ao tempo de 48 horas de todos os microrganismos utilizando cromatógrafo Gilson, bombas modelo 321, injetor Rheodyne, coluna Lichospher 100 RP 18 – Merck, detector UV no comprimento de onda de 257 nm, sistema gradiente (fase móvel Metanol na bomba A e Metanol/Tampão 65:35 na bomba B), fluxo 1,0 mL/min e tempo de corrida de 15 minutos.

### 2.3 – Estudo em escala semi-preparativa

Dentre os microrganismos ensaiados, *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 foi a primeira cepa escolhida para estudos em escala semi preparativa. Este fungo foi inoculado em oito Erlenmeyers (100mL de meio líquido PDSM em cada) segundo as condições já descritas no processo de *screening*, aumentando a quantidade do substrato para 50mg. Ao término da incubação, a biomassa foi separada por filtração em funil de Büchner com gaze e o micélio restante extraído com acetona sob agitação constante em agitador magnético, resultando em uma fração cetônica. O líquido obtido foi saturado com cloreto de sódio e filtrado sobre Celite a vácuo. Foram realizadas extrações com acetato de etila onde se obteve duas frações: uma fração aquosa e uma fração orgânica (extrato bruto). Essas frações foram analisadas por CCD e CLAE nas mesmas condições cromatográficas já descritas.

### 2.4 – Purificação e caracterização dos metabólitos

As frações cetônica e orgânica foram recristalizadas em metanol e as porções resultantes foram analisadas por CLAE. Pela similaridade dos derivados formados as

porções metanólicas foram reunidas e purificadas por *flash* cromatografia em coluna de vidro (26,5 x 2cm), utilizando sílica gel como fase estacionária e acetato de etila/metanol 95:5 como eluente.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 – Caracterização do substrato

A Varredura em UV no Espectrofotômetro foi feita para o LASSBio 579 em solução com metanol grau HPLC na concentração de 0,01mg/mL na faixa 200 – 800 nm que apresentou uma absorção máxima (0,89 AUFS) no comprimento de onda de 257 nm. Na análise por CLAE, determinou-se que o melhor método a ser utilizado é gradiente, com fase móvel variando entre metanol/metanol-tampão 65:35, fluxo de 1,0mL/min e corrida de 10 minutos, pois foi o que proporcionou um tempo de retenção para o LASSBio 579 (1mg/mL MeOH), 6,5 minutos, que possibilitaria a observação de compostos com tempo de retenção menores.

#### 3.2 – Screening

Quatro diferentes produtos foram formados pela incubação do substrato LASSBio 579 com as diversas cepas utilizadas. Metábólito I foi formado por diferentes cepas enquanto metabólito III e IV foram produzidos exclusivamente por umas das cepas. *Mucor griseocyanus* ATCC 1207a não formou nenhum metabólito. Pela incubação com *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 detectou-se formação de todos os derivados (I, II, III, IV) (Tabela 1).

Tabela 1: Bioconversão do LASSBio 579 por várias cepas de fungos filamentosos, tempo de 48 horas.

Microrganismos	Derivados			
	I	II	III	IV
<i>Absidia blakesleana</i> ATCC 26617	+++	-	-	-
<i>Absidia blakesleana</i> ATCC 10148b	++	-	-	-
<i>Aspergillus candidus</i> ATCC 2023	++++	-	-	-
<i>Aspergillus ochraceus</i> ATCC 1009	+++	-	-	-
<i>Beauveria bassiana</i> ATCC 7149	+++	-	-	-
<i>Chaetonium indicum</i> LCP 984200	++	-	-	-
<i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9244	++	+	+++	+
<i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 9245	-	++	-	-
<i>Cunninghamella elegans</i> ATCC 36112	++++	++	-	-
<i>Cunninghamella elegans</i> ATCC 26169	++	+	-	-
<i>Curvularia lunata</i> NRRL 2380	++	-	-	-
<i>Fusarium roseum</i> ATCC 14717	-	+	-	-
<i>Mortierella isabelina</i> NRRL 1757	-	++	-	-
<i>Mucor griseocyanus</i> ATCC 1207a	-	-	-	-
<i>Rhizopus arrhizus</i> ATCC 11145	++++	++	-	-

Legenda: Derivados formados no sobrenadante de incubação no período de 48 horas e analisados por CLAE: + 1 - 20%; ++ 21 – 60%; +++ 61 - 80%; ++++ > 80%; - ausência.

Devido à capacidade bioconversora apresentada e descrita na literatura, *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 foi a cepa de escolha para realização inicial

dos ensaios em escala semi preparativa (AZERAD, 1999).

### 3.3 – Estudo em escala semi-preparativa

O crescimento do fungo *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 mostrou-se satisfatório no período de sete dias. O aspecto das colônias apresentou-se homogêneo com excelente formação de esporos. Durante a incubação o aspecto morfológico do microrganismo em meio líquido PDSM apresentou-se como uma massa amorfa que ocupava um terço do Erlenmeyer de maneira difusa. A análise por CLAE permitiu determinar a presença de novos produtos formados no sobrenadante de incubação. Dentre os microrganismos utilizados, *Cunninghamella echinulata* foi a única cepa capaz de produzir todos os derivados observados, sendo o metabólito III o produto majoritário. Todos os derivados formados apresentaram tempos de retenção inferior ao do substrato (3,2 - I; 4,7 - II; 5,04 – III; 5,5 - IV), ou seja, produtos mais polares. Isso ocorreu devido a utilização de uma coluna fase reversa e fase móvel metanol/metanol:tampão 65:35. A figura 3 apresenta o cromatograma dos possíveis derivados obtidos durante o período de incubação.

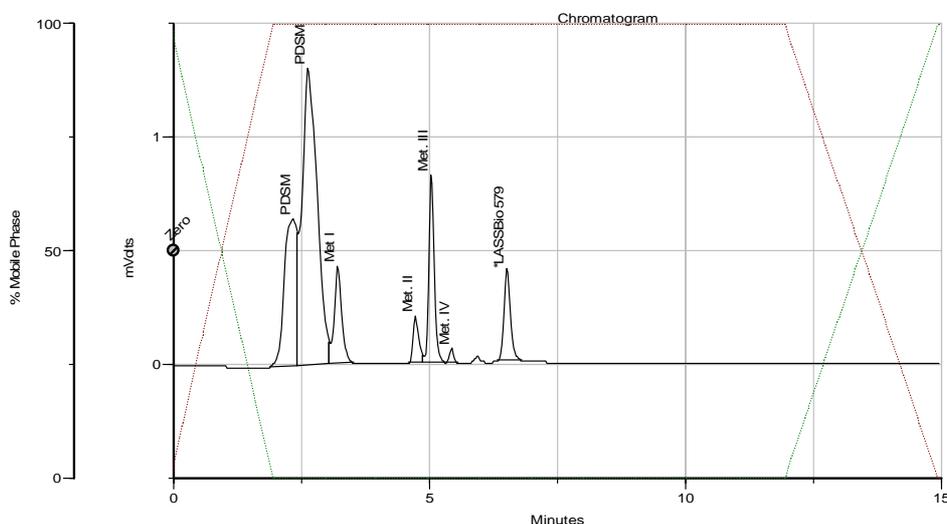


Figura 3: Derivados formados durante o período de incubação de 48 horas com *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244. Condições cromatográficas: Cromatógrafo Gilson, bombas modelo 321, injetor Rheodyne, coluna Lichrospher 100, RP 18-MERCK (250 x 4,6 mm x 0,5  $\mu$ ); fase móvel: Bomba A: Metanol, Bomba B: Metanol/Tampão 65:35; fluxo 1,0 mL/min; tempo de corrida: 10 minutos; detecção a 257 nm.

A concentração do substrato e a formação dos derivados podem ser observadas após a análise nos períodos de 24, 48, 72 horas por CLAE de acordo com a figura 4.

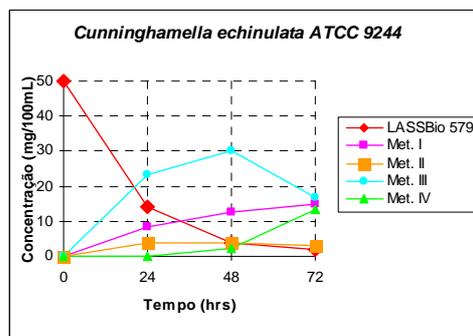


Figura 4: Representação gráfica da cinética de formação dos metabólitos do LASSBio 579 (1 mg/mL)

nos períodos de 24, 48, 72 horas por *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244. Condições cromatográficas: Cromatógrafo Gilson, bombas modelo 321, injetor Rheodyne, coluna Lichrospher 100, RP 18-MERCK (250 x 4,6 mm x 0,5 µ); fase móvel: Bomba A: Metanol, Bomba B: Metanol/Tampão 65:35; fluxo 1,0 mL/min, tempo de corrida: 10 minutos; detecção a 257 nm.

O perfil cromatográfico e a cinética de reação mostraram que para *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, o metabólito III foi o produto formado em maiores quantidades. Além disso, o substrato não foi completamente consumido.

### 3.4 - Purificação e caracterização dos metabólitos

Pelo espectro de massas de um dos produtos obtidos, podemos sugerir uma provável hidroxilação. Considerando  $M^+$  como a massa do LASSBio 579 igual a 353, infere-se que o íon molecular  $m/z$  370.1 ( $M^+ + OH$ ). (Figura 5).

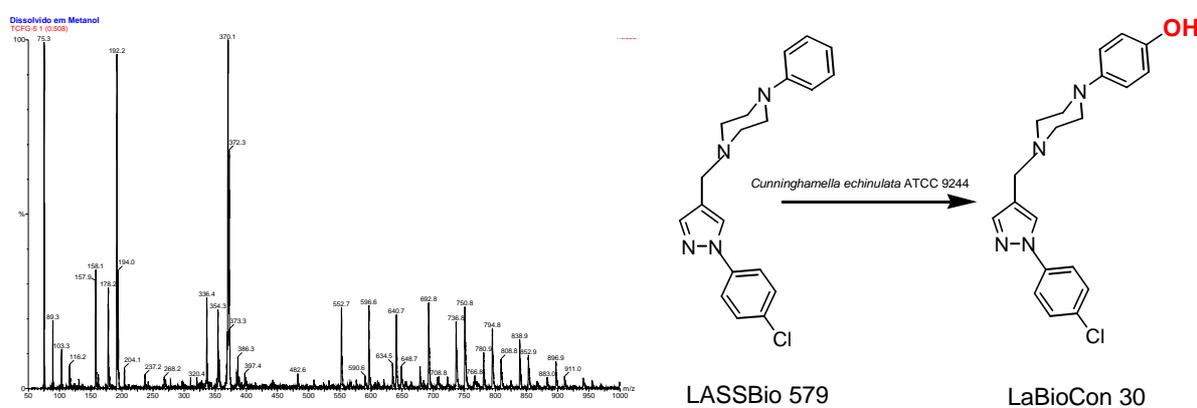


Figura 5: Determinação estrutural de um dos prováveis metabólitos utilizando EM.

## 4. CONCLUSÃO

A bioconversão mostrou-se uma ferramenta promissora para a biotransformação do substrato LASSBio 579 e todas as cepas empregadas foram capazes de produzir derivados funcionalizados, sendo que *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 apresentou os melhores rendimentos tornando possível preparação dos derivados para posterior elucidação estrutural.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZERAD, R. Microbial Models for Drug Metabolism. In: SCHEPER, Th. *Advances in Biochemical Engineering*, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1999. p. 169-218.

NEVES, G.; RATES, S. M. K.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Agentes Dopaminérgicos e o Tratamento da Disfunção Erétil. *Química Nova*, v.27, p.949-957, 2004.

SRISILAM, K. VEERESHAM, C. Biotransformation of drugs by microbial cultures for predicting mammalian drug metabolism. *Biotechnology advances*, v.21, p.3-39, 2003.

## FONTE DE FINANCIAMENTO – CAPES

<sup>1</sup> Aluna bolsista de mestrado. Faculdade de Farmácia - LaBioCon - Laboratório de Bioconversão, [tatifgomes@hotmail.com](mailto:tatifgomes@hotmail.com)

<sup>2</sup> Orientador/ Faculdade de Farmácia/UFG, [valeria@farmacia.ufg.br](mailto:valeria@farmacia.ufg.br)